(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0078737
(43) 공개일자 2015년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/212 (2006.01) *A23L 1/06* (2006.01)
A23L 1/064 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0168401
(22) 출원일자 2013년12월31일
심사청구일자 2013년12월31일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
송영철
대구 동구 큰고개로 23, 1동 512호 (신암동, 보성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

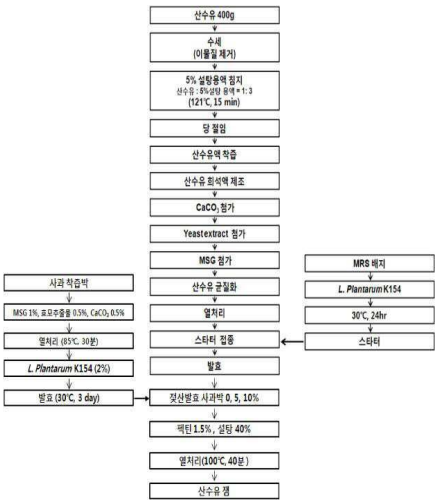
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **ＧＡＢＡ 생산 젖산균 및 젖산발효 사과박을 이용한 산수유 잼 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 GABA 생성 젖산균 및 젖산발효 사과박을 이용한 산수유 잼 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 GABA를 생산하는 젖산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용한 GABA 함유 산수유 잼에 관한 것이다. 본 발명은 산수유 및 GABA 생성 젖산균을 이용한 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함유 산수유 젖산 발효물 제조방법을 제공한다. 산수유 건조물을 모두 이용함으로써 산수유 열매의 고유의 색, 맛과 향을 그대로 살리면서 고농도 기능성 물질 GABA 및 식이섬유 증진 및 프로바이오틱(probiotic) 젖산균이 함유된 기능성 발효제품을 개발할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이효선

경북 포항시 남구 송림로56번길 17-7, (송도동)

이선하

대구광역시 북구 서변로 120번지 영남네오빌블루 101동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20130401

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가원

연구사업명 지역연구산업육성사업(RIS사업)

연구과제명 의성 연고자원을 활용한 바이오산업 육성사업

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 산수유를 멸균된 설탕용액에 침지하여 당절임하는 단계;

(2) 상기 당절임된 산수유를 착즙하고 물로 희석하여 산수유 희석액을 제조하는 단계;

(3) 상기 산수유 희석액 전체 100 중량부에 대해 $CaCO_3$ 0.1 내지 0.5 중량부, 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부 및 효모추출물(yeast extract) 0.5 내지 5 중량부를 첨가하여 혼합하는 단계;

(4) 상기 (3)단계에서 혼합된 혼합물을 열처리하는 단계; 및

(5) 상기 열처리된 혼합물에 젖산균 스타터(starter)를 접종하고 배양하여 발효시키는 단계를 포함하는 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)함유 산수유 젖산 발효물 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (2)단계의 산수유 희석액은 희석배수가 1 내지 10배인 것을 특징으로 하는 산수유 젖산 발효물 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (4)단계의 열처리는 70 내지 90℃에서 30 내지 60분 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 산수유 젖산 발효물 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 젖산균은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주인 것을 특징으로 하는 산수유 젖산 발효물 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (5) 단계의 발효는 25 내지 30℃에서, 48 내지 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 산수유 젖산 발효물 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 제조된 산수유 젖산 발효물.

청구항 7

(1) 산수유를 멸균된 설탕용액에 침지하여 당절임하는 단계;

(2) 상기 당절임된 산수유를 착즙하고 물로 희석하여 산수유 희석액을 제조하는 단계;

(3) 상기 산수유 희석액 전체 100 중량부에 대해 $CaCO_3$ 0.1 내지 0.5 중량부, 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부 및 효모추출물(yeast extract) 0.5 내지 5 중량부를 첨가하여 혼합하는 단계;

(4) 상기 (3)단계에서 혼합된 혼합물을 열처리하는 단계;

(5) 상기 열처리된 혼합물에 젖산균 스타터(starter)를 접종하고 배양하여 발효시키는 단계; 및

(6) 상기 발효된 산수유 젖산 발효물 전체 100 중량부에 대해 젖산발효 사과박 1 내지 10 중량부, 팩틴 1 내지 3 중량부 및 설탕 20 내지 50 중량부를 첨가하여 가열하는 단계를 포함하는 GABA 함유 산수유 잼 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 GABA 생성 젖산균 및 젖산발효 사과박을 이용한 산수유 잼 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 GABA를 생산하는 젖산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 이용하여 고농도 GABA 및 사과 식이섬유가 함유된 산수유 잼에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자연계에 존재하는 식물 중에 질병의 방지와 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 기능성 성분들이 다량 함유되어 있다는 것이 밝혀져 천연식품소재에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 산수유(*Cornus Officinalis*)는 중국과 우리나라 중부지방 이남에 자생하는데, 3~4월에 노란 꽃이 잎보다 먼저 피고 열매는 길고 둥근 모양으로 10월에 붉게 익는다. 보통 잘 익은 산수유 과실을 채취하여 햇볕에 일주일 정도 말린 다음 씨를 제거한 과육을 다시 햇볕에 완전히 건조하여 사용한다. 다양한 효능과 향이 있어 한방 및 민간요법에서 오랫동안 사용되어 왔던 약재이며, 술과 차, 한양의 재료로 많이 사용되고 있다. 과육 속의 성분을 보면 부교감신경 흥분작용이 있는 것으로 알려져 있는 코르닌(cornin)을 비롯하여 모로니사이드(morroniside), 로가닌(loganin), 타닌(tannin), 사포닌(saponin) 등의 배당체와 갈산(gallic acid), 리놀산(linolic acid), 팔미트산(palmitic acid), 우르솔산(ursolic acid) 등의 유기산이 함유되어 있고, 그밖에 비타민 A와 다량의 당이 포함되어 있다. 산수유는 18가지의 무기질과 풍부한 K, Ca, Mg, 아미노산을 함유하고 있어 간이나 신장을 보호하는 효과가 있다고 하였으며, 동의보감과 한약집성방 등에 의하면 강음(强陰), 신정(腎精), 신기(腎氣)보강, 수렴 등의 효능이 있다고 한다. 두통, 이명, 해열 월경과다 등에 약재로 쓰이며, 식은땀, 야뇨증 등의 민간요법에도 사용된다. 또한 차나 술로 장복하면, 지한(止汗), 보음(補陰) 등의 효과가 있다고 알려져 있다.

[0004] 산수유추출물의 대표적인 약리작용을 알아보면 수렴작용, 이뇨작용, 항알러지 기능, 혈압강하 및 항균작용과 같은 다양한 약리작용을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 또한 산수유 추출물과 관련된 최근 연구에서 로가닌(loganin)이 기억력 증진에 효능이 있는 것으로 보고하였으며, 올레오놀산(oleanolic acid)이 아세틸콜린(acetylcholine)의 분비를 증가시켜 인슐린 분비를 촉진시키는 능력이 있다고 하였다. 또한 산수유 추출물에서 분리한 코르누시드(cornuside)가 혈관의 평활근을 확장시킨다고 보고하였고, 활성산소 제거 능력이 있는 항산화물질로서 간암(hepatocellular carcinoma) 이나 백혈병(leukemic cell)에 항암효과가 있다고 하였으며, 다당체(polysaccarides)가 면역기능을 강화시킨다고 하였고, 모로니사이드(morroniside)가 산화적 스트레스에 의한 신경세포 독성을 예방하는 효과가 있다고 하였다.

[0005] 산수유에 대한 연구로는 항산화능, 항암활성, 건조에 따른 과육분리 특성, 산수유를 이용한 약주 및 전통차 개발에 대한 일부 연구가 보고되어 있으나, 국내에서는 거의 연구가 이루어지지 않은 실정이며, 현재까지 보고된 산수유 관련 학술논문 및 특허는 단순가공, 기능성 평가 및 과육분리 기술개발이 일부 진행되었다. 국외에서는 많은 기업들이 산수유를 분말 및 추출물 상태로 판매하고 있으며, 산수유로부터 최근 항당뇨 활성(α-glucosidase inhibition)이 보고되어 있다. 특히 산수유는 신맛이 강하여 식품소재로 활용이 제한적이며, 가공 또는 발효를 통한 소재의 가공적성 향상 및 기능성이 강화된 건강소재로 개발이 요구된다.

[0006] 감마 아미노부티르산(gama amino butyric acid; GABA)은 4-아미노부틸산으로써 L-글루타메이트(L-glutamate) 기질이 탈탄산 반응에 의해 생성되며, 이에 관여하는 효소로는 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase; GAD)가 있으며 피리독시드-5'-포스페이트(pyridoxid-5'-phosphate) 의존성 경로로 합성된다. GABA는 단백질에서는 발견이 되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. GABA는 글루타메이트(glutamate)가 신경을 활성화시키는 것과는 달리 신경활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 기능은 신경세포의 기능과 정보처리에 지대한 영향을 미치게 되는데 특히 감각 뇌에서 방향 민감성, 각도 민감성 반응 등을 결정하며 정교한 운동기능도 조율하는 것으로 알려져 있다. GABA의 뇌혈류 촉진 효과와 산소공급 증가효과는 뇌세포의 대사를 촉진시킴으로써 뇌졸중의 후유증 및 뇌동맥경화증 등에 개선효과가 나타나 의약품으로 사용되고 있다. GABA의 기능성이 알려지면서 의약품으로서 뿐만 아니라 기능성 식품소재로 이용하고자 하는 연구가 많이 시도되고 있으며, 이들 연구들은 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있는 GABA의 함량을 증대시키는 데 집중되어 있다. 그러나 자연계의 식물을 원재료로 한 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 대량 생산하기 위해서는 미생물을 이용한 연구가 필요한 실정이다.

[0007] 사과박은 사과를 착즙 후에 발생하는 부산물로써 사과의 무기질 등 영양성분과 식이섬유 함량이 높은 소재이지만, 미생물 번식 등 저장성이 약해 쉽게 변질되는 관계로 사과 주스등의 식품제조과정에서 폐기되거나 사료로 사용되고 있기에 이런 부산물의 활용방안이 필요한 실정이다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 발효기술을 통한 생리활성물질이 다량 함유된 천연물을 포함하며 일반인이 용이하게 섭취할 수 있는 식품소재 및 제품을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 산수유 열매의 착즙액과 착즙박을 열처리하여 미생물을 사멸시키고, $CaCO_3$를 첨가하여 pH 안정성을 높이고 산도를 낮추어 여기에 젖산균을 생육시킴으로써 여러 가지 생리활성물질을 증진시킨 후, 이 산수유 열매 발효물을 원료로 비열처리된 젖산균 프로바이오틱(probiotic)을 함유한 젖산 발효물을 성공적으로 제조하고, 고농도 GABA 및 젖산발효 사과 식이섬유 함유 산수유 잼을 제조하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1319984호(2012.12.27 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 산수유 열매 및 GABA 생성 젖산균을 이용한 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함유 산수유 젖산 발효물 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기의 방법에 의해 제조된 산수유 젖산 발효물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 산수유 젖산 발효물에 젖산발효 사과박을 첨가하는 GABA 함유 산수유 잼 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 한번 착즙 할 때 건조된 산수유 열매 400g을 선별한 후 121℃에서 15분간 멸균한 5% 설탕물에 산수유를 4배 희석하여 24시간 동안 냉장고에서 침지시킨다. 그리고 저속 압착식 착즙기를 이용하여 착즙한 후, 착즙액과 착즙박을 모두 섞어, 페이스트(paste) 상태로 만들어 준 후, 페이스트(paste)를 증류수로 1, 2, 5배 희석하여 사용하였다. 발효시에 pH 안정성을 위해 $CaCO_3$를 0.5% 첨가하고, GABA 생산을 위해 MSG 2%를 첨가하였다. 그리고 영양원의 보충을 위해 효모추출물(yeast extract)을 농도별로 첨가하였다. 섞어준 모든 첨가물과 산수유의 균질화를 위하여 4,500 rpm에서 10분 동안 균질화를 하고, 미생물의 사멸을 위해 80℃ 항온수조에서 30분 동안 열처리 한 후, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 1일 동안 배양한 스타터(starter)를 1% 첨가하여 3일 동안 발효하여 분석하였다. 이렇게 발효된 산수유에 사과를 착즙하고 나온 박에 MSG 1%, 효모추출물(yeast extract) 0.5%, $CaCO_3$ 0.5%를 고르게 혼합한 후 85℃에서 30분간 열처리하여, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 2% 접종하여 30℃에서 3일간 발효한 젖산발효 사과박을 0, 5, 10%의 범위로 첨가하고 펙틴 1.5%, 설탕 40%를 첨가한 후 100℃에서 40분간 열처리 하여 잼을 제조하여 분석하였다(도 1).

[0014] 본 발명은 (1) 산수유를 멸균된 설탕용액에 침지하여 당절임하는 단계; (2) 상기 당절임된 산수유를 착즙하고 물로 희석하여 산수유 희석액을 제조하는 단계; (3) 상기 산수유 희석액 전체 100 중량부에 대해 $CaCO_3$ 0.1 내지 0.5 중량부, 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부 및 효모추출물(yeast extract) 0.5 내지 5 중량부를 첨가하여 혼합하는 단계; (4) 상기 (3)단계에서 혼합된 혼합물을 열처리하는 단계; 및 (5) 상기 열처리된 혼합물에 젖산균 스타터(starter)를 접종하고 배양하여 발효시키는 단계를 포함하는 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)함유 산수유 젖산 발효물 제조방법을 제공한다.

[0015] 상세하게는, 상기 (2)단계의 산수유 희석액은 희석배수가 1 내지 10배인 것을 특징으로 하고, 상기 (4)단계의 열처리는 70 내지 90℃에서 30 내지 60분 동안 처리하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상세하게는 상기 젖산균은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서 사용된 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주는 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154(KACC91727P)로서 한국식품과학연구원으로부터 분양받아 사용하였다.

[0017] 상세하게는, 상기 (5)단계의 발효는 25 내지 30℃에서, 48 내지 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에 있어서, "스타터(starter)"란 발효물을 제조하는 경우에 사용하는 미생물 배양액을 말한다. 따라서 스타터 미생물의 종류는 그 제품의 특성을 결정하게 되며 제품의 품질에 중요한 영향을 미친다. 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등을 들 수 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 산수유 젖산 발효물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 산수유 젖산 발효물을 이용한 산수유 잼 제조방법을 제공하는데, 바람직하게는 상기 산수유 젖산 발효물 전체 100 중량부에 대해 젖산발효 사과박 1 내지 10 중량부, 팩틴 1 내지 3 중량부 및 설탕 20 내지 50중량부를 첨가하여 가열하는 단계를 포함하는 GABA 함유 산수유 잼 제조방법이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 GABA 생성 젖산균 및 젖산발효 사과박을 이용한 산수유 잼 제조방법에 관한 것으로서, 약리효과가 우수한 산수유 열매에 김치 젖산균을 이용한 젖산발효를 통하여 GABA가 함유되어 있는 기능성 식품개발을 목표로 수행하였으며, 산수유 건조물을 모두 이용함으로써 산수유 열매의 고유의 색, 맛과 향을 그대로 살리면서 기능성 물질 GABA 증진 및 프로바이오틱(probiotic) 젖산균이 함유된 기능성 발효제품을 개발하고자 하였다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 산수유 젖산 발효 및 잼 제조 과정을 도식화한 것이다.

도 2는 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154의 GABA 생성 확인 결과이다.

도 3은 산수유 열처리 시간에 따른 색도 변화를 나타낸다.

도 4는 0.5% $CaCO_3$ 첨가에 따른 산수유 젖산 발효의 pH 및 산도 변화를 나타낸다.

도 5는 2% MSG를 첨가한 산수유 착즙액의 희석배수에 따른 pH 및 산도 변화를 나타낸다.

도 6은 2% MSG를 첨가한 산수유 착즙액의 희석배수에 따른 GABA 시험 결과이다. [1)]발효시간(일), [2)]대조군: MSG 없음, [3)]산수유 페이스트(paste) 희석배수.

도 7은 2% MSG를 첨가한 산수유 착즙액의 2배 희석한 발효물의 GABA 시험 결과이다. 전개용매에 2번 전개 후 발색한 TLC 결과이다.

도 8은 0.5% 효모추출물(Yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 pH 및 산도 변화를 나타낸다.

도 9는 0.5% 효모추출물(Yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 GABA 시험 결과를 나타낸다. [1)]발효시간(일), [2)]희석배수.

도 10은 1% 효모추출물(Yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 pH 및 산도 변화를 나타낸다.

도 11은 1% 효모추출물(Yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 GABA 시험 결과를 나타낸다.

[1)]발효시간(일), [2)]산수유 페이스트(paste) 희석배수.

도 12는 효모추출물(Yeast extract)을 농도별로 첨가한 산수유 젖산 발효물의 pH, 산도 변화를 나타낸다.

도 13은 효모추출물(Yeast extract)을 농도별로 첨가하여 2배 희석한 산수유 젖산 발효물의 GABA 시험 결과를 나타낸다.

도 14는 젖산발효 사과박을 첨가한 산수유 젖산발효물의 발효잼의 GABA 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0024] **< 실시예 1 > 미생물의 생육 및 GABA 시험**

[0025] GABA 생성능이 우수한 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주(KACC91727P)는 한국식품과학연구원으로부터 분양받아 사용하였다. 그리고 발효에 젖산균을 이용하기 위하여 표 1에 나타낸 MRS 액체 배지를 이용하여 MRS agar 배지에서 생장시킨 단일 콜로니(colony)를 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 사용하였다.

표 1

[0026] MRS 배지의 조성

성 분	성분비(그람/리터)
프로테오스 펩톤 #3	10.0
쇠고기 추출물	10.0
효모 추출물	5.0
덱스트로즈	20.0
폴리솔베이트 80	1.0
암모늄 시트레이트	2.0
소디움 아세테이트	5.0
마그네슘 설페이트	0.1
망간 설페이트	0.05
디포타시움 포스페이트	2.0

[0027] 젖산균의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 MRS 배지와 MSG 0.5%를 포함한 MRS배지에 각각 순수분리된 젖산균을 한 백금이 접종하여 48시간 동안 배양하여 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다(도 2).

[0028] **< 실시예 2 > 산수유 건조물과 발효 전 희석액 분석**

[0029] 건조된 산수유 열매와 당절임 추출액의 분석 결과는 표 2와 같다. 건조물을 침지시키지 않았을 때의 수분은 18.17%, 당도 58 ° Brix, pH 3.2, 산도 15.53% 이었으며, 5% 설탕물에 건조물을 4배 희석하여 침지시킨 후 분석한 결과는 수분함량 74.41%, 당도 18.7 ° Brix, pH 3.31, 산도 3.77%로 나타났다. 산수유 건조물 자체의 산도는 젖산 발효하기에 높고 수분함량도 낮아 과육과 비슷한 조건을 맞추기 위해 5% 설탕물에 건조물을 4배 희석하여 사용하였다. 침지시키고 난 후 균질기(homogeniger)를 이용하여 페이스트(paste) 상태로 만든 것을 원액으로 보고 희석하여 발효하였다.

표 2

[0030] 산수유 건조물의 당절임 후 이화학적 분석

	산수유 건조물	당절임 산수유
수분 함량 (%)	18.17±0.01	74.41±0.01
당도 (° Brix)	58	18.70±0.42
pH	3.2±0.01	3.31±0.01
산도 (%)	15.53±0.12	3.77

[0031] **< 실시예 3 > 젖산 발효를 위한 열처리 시간 최적화**

[0032] 산수유 열매 과육의 색 변화의 최소화를 위해 열처리를 하지 않고 젖산 발효를 해보았더니 젖산 발효가 되지 않음을 알 수 있었다. 또한 젖산균과 동시에 점질물을 생성하는 바실러스(*Bacillus*) 균주가 동시에 올라왔다. 그래서 pH, 당도, 생균수 변화 산수유의 색 변화의 최소화 및 미생물의 사멸을 위해 적합한 시간을 알아보았다.

[0033] 산수유 페이스트(paste)의 pH는 3.30, 산도 2.70%, 당도는 12.73 ° Brix, 생균수는 2.18×10^2 CFU/g이었다. 산수유 페이스트(paste)를 80℃ 항온수조에서 0, 15, 30, 45, 60분 동안 열처리한 후 물리화학적 변화 및 생균수를 측정 한 결과 열처리 후 잔존하는 생균수는 열처리 0분에 2.18×10^2 CFU/g, 15분에 1.1×10 CFU/g, 30분 열처리 시 미생물이 검출되지 않았다(표 3). 색의 변화를 보기 위해 측정한 색도의 결과는 도 3과 같다. 열처리 시간이 길어질수록 pH와 산도는 비슷한 값을 보였으나, 색도는 45분부터 L값이 감소하고 a, b 값은 증가하는 경향을 보였다.

표 3

[0034] 산수유 열처리 후 생균수의 변화(CFU/g)

열처리 시간 (분)				
0	15	30	45	60
2.18×10^2	1.1×10	ND[1)]	ND	ND

[0035] [1)]ND : 검출되지 않음.

[0036] **< 실시예 4 > $CaCO_3$ 첨가에 따른 젖산 발효 최적화**

[0037] 산수유 페이스트(paste)에 $CaCO_3$를 첨가하여 pH 변화에 대한 결과는 표 4와 같다. 중화제로서의 하나인 $CaCO_3$는 영양소 흡착 및 세포벽 강화 기능이 높다는 연구결과에 의하여 산수유 착즙액의 산도가 3.37%로 젖산균 생육이 어려운 환경이기에 산도를 낮추고 pH 안정성을 높이기 위해 $CaCO_3$를 첨가 하였으며, 산수유 착즙액에 $CaCO_3$를 농도별로 첨가하였다. $CaCO_3$를 0.5% 첨가한 산수유 착즙액의 pH는 3.2에서 pH 4.53으로 증가하였으며 산도는 3.37%에서 2.11%로 감소하여(표 4), 이화학 및 물성학적 특성이 적절한 것으로 나타났다.

표 4

[0038] $CaCO_3$ 농도에 따른 산수유의 pH 변화

$CaCO_3$ 농도 (%)	희석배수			
	1배	2배	5배	10배
0	3.2	3.27	3.27	3.32
0.1	3.47	3.96	3.96	4.6
0.2	3.74	4.68	4.68	5.38
0.3	4.02	5.2	5.2	6.23
0.4	4.29	5.45	5.45	7.35

0.5	4.53	5.53	5.53	8.02

[0039] **< 실시예 5 > $CaCO_3$를 첨가한 산수유 착즙액의 희석배수에 따른 젖산 발효**

[0040] 산수유 착즙액에 $CaCO_3$를 0.5% 첨가하여 산수유 착즙액을 희석농도별로 발효하여 본 결과, 젖산균은 희석하지 않은 착즙액에서 생균수가 5.0×10^6 CFU/g에서 2일째까지 2.5×10^7 CFU/g까지 증가하였다가 3일째에 다시 7.0×10^6 CFU/g으로 감소하는 경향을 보였으나 2배 희석한 발효물은 3.1×10^7 CFU/g에서 1.1×10^9 CFU/g으로 크게 증가하여 3일째까지 유지되는 경향을 보였다(표 5).

표 5

[0041] 0.5% $CaCO_3$를 첨가한 산수유 착즙액의 희석배수에 따른 생균수 변화(CFU/g)

발효시간 (일)	희석배수		
	1	2	5
0	5.0×10^6	3.1×10^7	3.5×10^7
1	5.3×10^6	1.3×10^9	1.3×10^9
2	2.5×10^7	1.4×10^9	9.8×10^8
3	7.0×10^6	1.1×10^9	1.0×10^4

[0042] pH와 산도를 측정하였을 때, 표 6 및 도 4에서 보는 바와 같이, 2배 희석한 발효물이 0.31%에서 3일째 0.82%까지 크게 증가 하여 가장 많은 산을 생성하는 것을 알 수 있었다. 반면에 표 6에서 산도가 높았던 원액에서는 산도가 증가함에도 불구하고 pH가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 $CaCO_3$가 pH 완충 작용을 하여 pH가 감소하지 않은 것으로 사료된다. 결론적으로 산수유 페이스트(paste)에 $CaCO_3$를 0.5% 첨가하여 2배 희석한 후 젖산 발효시킨 발효물에서 pH 안정성을 높이고 젖산균의 생육이 우수한 조건으로 판단되었다.

표 6

[0043] 0.5% $CaCO_3$를 첨가한 산수유 착즙액의 희석배수에 따른 pH와 산도의 변화

	희석배수	발효시간 (일)			
		0	1	2	3
pH	1	3.28	3.31	3.31	3.33
	2	4.99	4.53	4.19	4.04
	5	6.45	6.27	5.27	4.57
산도 (%)	1	2.11	2.01	2.33	2.39
	2	0.31	0.37	0.61	0.82
	5	0.06	0.06	0.11	0.23
당도 (° Brix)	1	11.90	11.80	11.75	11.65
	2	7.00	7.03	6.85	6.75
	5	2.60	2.67	2.60	2.50

[0044] **< 실시예 6 > MSG 2% 첨가한 젖산 발효물의 GABA 함량 분석과 물리 화학적 분석**

[0045] MSG를 첨가한 산수유 젖산 발효물의 GABA 생산 최대화를 위해 산수유 페이스트(paste) 희석 배수 별, 젖산균의 영양성분이 되는 효모추출물(yeast extract) 농도별, MSG 농도별로 GABA 생산의 최대화를 위한 최적 조건을 정하기 위한 실험을 수행하였다. 산수유 열매 페이스트(paste)를 열처리 한 후, 총 부피의 0.5% $CaCO_3$을 첨가하고, MSG가 어느 정도 전환되는지를 보기 위하여 총 부피의 MSG 2%를 동일하게 첨가한 뒤, 산수유 착즙액

을 희석 배수별로 발효하여 보았다.

[0046] 생균수는 산수유 발효액을 기간별로 채취하여 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 측정하였으며, 표 7에 나타내었다. 도 5에 나타난 결과에 의하면 pH 또한 2배 희석한 발효물에서 산의 생성으로 인해 4.56에서 4.20까지 감소하였고, 총 산도(total acidity)는 0.57%에서 1.21%까지 증가하는 것을 확인하였다.

표 7

[0047] 2% MSG를 첨가한 산수유 착즙액의 희석배수에 따른 생균수 변화(CFU/g)

희석 배수	발효 시간 (일)			
	0	1	2	3
1	4.0×10^{7}	1.2×10^{9}	1.3×10^{9}	1.5×10^{8}
2	3.5×10^{7}	9.5×10^{8}	1.3×10^{9}	1.1×10^{9}
5	4.1×10^{7}	5.0×10^{8}	7.0×10^{8}	1.2×10^{8}

[0048] 이러한 발효물에서 GABA 생성능을 분석하기 위하여 TLC를 이용하여 분석하여 도 6에 나타내었다. 도 6에서 보는 바와 같이 뚜렷하게 전개되지 않아 GABA를 확인 할 수 없어 최적조건 발효물을 한 번 전개하고 완전히 건조한 뒤, 도 7과 같이 전개용매에 다시 한 번 2차 전개하였다. 그 결과 MSG도 MSG line에 근접하게 전개되었고, GABA spot도 확인할 수 있었다. 그러나 김치와 요구르트에서 GABA 생산이 높은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*를 분리하여 MSG 1%가 함유된 MRS 배지에 배양한 결과 ℓ 당 3.68 g의 GABA가 생성되었다는 보고와 비교하였을 때 낮은 수치라고 생각되어, 젖산균의 생육에 도움이 되는 효모 추출물(yeast extract)을 첨가하여 발효를 수행하였다.

[0049] **< 실시예 7 > GABA 생산능을 최대화시키기 위한 효모추출물 첨가 발효**

[0050] 산수유 페이스트(paste)의 젖산 발효 가속화, 생균수 증진 및 영양분 공급을 통하여 GABA 생산 능을 최대화하기 위하여 식용 효모추출물(yeast extract)을 농도별로 첨가한 후 그 효과를 알아보았다. 이전 실험과 비교를 위하여 MSG 2%를 동일하게 첨가하고, 추가로 효모추출물(yeast extract)을 0.5% 첨가하여 희석 배수 별로 발효하여 보았다. 그 결과, 생균수는 모든 희석 배수에서 3일째까지 10^{9} CFU/g으로 유지 되었다(표 8).

표 8

[0051] 0.5% 효모추출물(Yeast extract)를 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 생균수 변화(CFU/g)

희석 배수	발효 시간 (일)			
	0	1	2	3
1	3.3×10^{7}	1.9×10^{9}	2.1×10^{9}	2.3×10^{9}
2	3.3×10^{7}	4.1×10^{9}	3.3×10^{9}	2.4×10^{9}
5	3.3×10^{7}	2.7×10^{9}	2.4×10^{9}	2.6×10^{9}

[0052] 총 산도(Total acidity)는 효모추출물(yeast extract)을 첨가하지 않고 2배 희석한 발효물에서 0.64%까지 증가하였는데 반해 효모추출물(yeast extract)을 0.5% 첨가한 발효물에서는 산도가 1.07% 까지 증가하였고, 5배 희석한 발효물에서는 1.20%까지 증가하는 결과를 나타냈다(표 9 및 도 8). 당도는 발효 시간이 지날수록 0.7 ° Brix 감소하여 젖산균이 생육하면서 효모추출물(yeast extract)을 소비 한 것을 확인할 수 있었다(표 9).

표 9

[0053] 0.5% 효모추출물(Yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 pH, 산도 및 당도 변화

	희석 배수	발효 시간 (일)			
		0	1	2	3
pH	1	4.11	4.03	4.06	4.02
	2	4.62	4.09	4.10	4.04
	5	5.87	4.20	4.21	4.13
산도 (%)	1	2.41	2.34	2.48	2.79
	2	0.90	1.65	1.61	1.97
	5	0.18	1.22	1.22	1.38
당도 (° Brix)	1	17.85	17.50	17.60	17.40
	2	10.50	10.50	9.90	9.95
	5	6.25	5.60	5.80	5.55

[0054] 이러한 결과를 바탕으로 GABA 생산능을 분석하여 보았을 때 0.5% 효모추출물(yeast extract)을 첨가하여 2배 희석한 발효물에서 발효 2일째까지 GABA spot이 증가하다가 2일째와, 3일째는 육안상으로 거의 비슷한 spot 크기를 보였는데, 이는 GABA standard 5 ㎍에 못 미치는 결과를 나타냈다.

[0055] 효모추출물(yeast extract) 농도를 더 높여 1% 첨가하여 발효를 수행하였다. 그 결과, 생균수는 효모추출물(yeast extract)를 0.5% 첨가한 것과 비슷한 결과로 3일째까지 모두 10^9 CFU/g으로 유지되는 것을 확인 하였다(표 10).

표 10

[0056] 1% 효모추출물(yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 생균수 변화(CFU/g)

희석 배수	발효 시간 (일)			
	0	1	2	3
1	3.4×10^7	1.3×10^9	1.5×10^9	1.9×10^9
2	3.1×10^7	3.3×10^9	3.0×10^9	2.9×10^9
5	3.5×10^7	3.7×10^9	3.2×10^9	2.3×10^9

[0057] 효모추출물(yeast extract)을 1% 첨가하여 2배 희석한 발효물의 산도는 1.07%에서 2.09%로 1.02% 증가하는 결과를 나타내어 효모추출물(yeast extract)을 0.5% 첨가하였던 발효물에서 1.07% 증가한 것과 거의 유사한 결과값이 나타났다(표 11 및 도 10).

표 11

[0058] 1% 효모추출물(yeast extract)을 첨가한 산수유 젖산 발효물의 희석배수별 pH, 산도 및 당도 변화

	희석배수	발효 시간 (일)			
		0	1	2	3
pH	1	4.06	4.06	4.06	3.98
	2	4.65	4.19	4.06	3.98
	5	5.66	4.31	4.17	4.14
산도 (%)	1	2.49	2.3	2.49	2.78
	2	1.07	1.54	1.9	2.09
	5	0.28	1.05	1.3	1.4
당도 (° Brix)	1	18	17.6	17.4	17.5

2	10.8	10.7	10.35	10.35
5	6.35	6.1	6.35	6.4

[0059] GABA 생산능을 측정한 TLC 결과는 2배 희석한 발효물의 GABA spot이 가장 뚜렷하게 나타났으며, GABA standard와 비교하였을 때, 1 ㎍과 5 ㎍의 사이 정도인 것으로 보였다. 효모추출물(yeast extract)을 0.5% 첨가한 조건과 비슷한 결과를 나타내었다(도 11).

[0060] 산수유 착즙액을 2배 희석한 최적 조건에서 영양공급원인 효모추출물(yeast extract)을 2%, 5% 첨가하여 발효하였다. GABA는 2일째 이후로 더 이상 증가하지 않는 이전의 결과를 토대로 2일까지 발효하였다.

[0061] 표 12에서 보는 것과 같이, 생균수는 2일째에 10^9 CFU/g으로 증가하였으며, pH는 2일째까지 효모추출물(yeast extract)을 2%, 5% 첨가한 것에서 pH 4.27, 4.28로 비슷한 수치를 나타내었다. 산도는 2% 첨가한 것에서 1.58-1.89%로 0.31% 증가하였으며, 5%첨가한 조건에서는 1.61-2.66%로 1.05% 증가하였다(표 13). 효모추출물(yeast extract) 농도에 따른 GABA 함량을 보기 위해 TLC를 이용하여 GABA 함량을 비교한 결과를 도 12에 나타내었다. 발효 2일째까지 MSG가 많이 소진되었고, GABA 함량이 standard와 비교할 수 없이 높게 나타나 시료를 2배 희석하여 비교해 보았더니 GABA가 5㎍인 0.25% 보다 더 진하게 나타나 0.3% 정도로 예상이 가능할 것으로 보여, 2배 희석하지 않은 원액에서는 0.6% 정도까지 함유한 것으로 예상된다.

표 12

[0062] 효모추출물(yeast extract)이 첨가된 산수유 젖산 발효물의 생균수 변화

효모추출물 농도 (%)	발효시간(일)		
	0	1	2
2	$3.2X10^7$	$1.1X10^8$	$3.1X10^9$
5	$3.2X10^7$	$3.7X10^8$	$3.4X10^9$

표 13

[0063] 효모추출물(yeast extract)이 첨가된 산수유 젖산 발효물의 pH, 산도 및 당도 변화

	Y.E 농도(%)	발효 시간 (일)		
		0	1	2
pH	2	4.36	4.29	4.27
	5	4.45	4.37	4.28
산도 (%)	2	1.58	1.75	1.89
	5	1.61	2.23	2.66
당도 (° Brix)	2	13.85	13.40	13.15
	5	16.20	16.25	16.65

[0064] **< 실시예 8 > 젖산발효 사과박의 이화학적 특성 및 GABA 분석**

[0065] 사과를 착즙하며 발생한 박의 중량대비 MSG 1%, 효모추출물(yeast extract) 0, 0.5%와 $CaCO_3$ 0.5%를 첨가하여 고르게 섞어준 후 85℃에서 30분간 열처리하여 살균 후 MRS broth에서 배양한 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 2% 접종하여 30℃에서 3일간 정치배양하여 발효하였다.

[0066] 표 14에서 보는 바와 같이 효모 추출물(yeast extract)을 0%, 0.5% 첨가한 조건에서 pH는 발효 3일째 각각 6.45, 3.98로 나타났으며 효모추출물을 0.5% 첨가한 조건에서 발효가 더 잘 일어나는 것을 알 수 있었고 산도 또한 1.93%까지 증가하는 것으로 나타났다. 생균수는 사과박의 발효기간이 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며 발효 3일 째 각각 6.21×10^6, 2.06×10^8 CFU/mL로 0.5% 효모추출물(yeast extract)이 첨가된 조건에서 생균

수가 높게 나타났다. GABA 함량은 젖산발효 사과박을 증류수에 3배 희석하여 측정한 결과 0, 0.5%효모추출물(yeast extract)을 첨가한 조건에서 발효 3일 째 GABA 함량은 각각 0.17%, 0.3%로 효모추출물(yeast extract)이 첨가될수록 GABA 함량이 증가하는 것으로 나타났다(도 14).

표 14

[0067] 효모추출물(yeast extract)이 첨가된 사과박 젖산 발효물의 pH, 산도 및 생균수 변화

	Y.E 농도(%)	발효 시간 (일)			
		0	1	2	3
pH	0	6.65	6.47	6.45	6.45
	0.5	6.13	4.18	4.04	3.98
산도 (%)	0	0.09	0.09	0.09	0.09
	0.5	0.18	1.62	1.8	1.93
생균수 (CFU/mL)	0	0	6.50×10^{7}	1.5×10^{7}	6.21×10^{6}
	0.5	0	5.35×10^{8}	4.95×10^{8}	2.06×10^{8}

[0068] **< 실시예 9 > 젖산발효 사과박을 첨가한 산수유 젖산발효 잼의 이화학적 특성, GABA 분석 및 관능평가**

[0069] NUC 착즙기를 이용하여 사과를 착즙하고 발생된 사과박의 수분함량과 식이섬유함량은 각각 74.6%, 42.91%로 나타났으며, 젖산발효한 사과박을 5, 10% 첨가하여 잼 제조에 이용하였다. 또한 펙틴 1.5%, 산수유 무게 대비 40%의 설탕을 첨가하여 100℃, 40분간 가열하며 잼을 제조하였다.

[0070] 그 결과 사과박 첨가한 조건에서 pH 4.21로 나타났으며, 산도는 사과박 첨가 농도가 높을수록 산도는 감소하는 경향을 보였다(표 15). 생균수는 열처리에 따라 모두 검출되지 않았고, 전자식 굴절당도계를 이용하여 측정한 당도는 사과박이 5, 10% 첨가된 조건에서 당도가 각각 53, 50 ° Brix 로 나타났다. Brookfield 점도계 LV 모델을 이용하여 spindle number 4를 이용하여 rpm 0.3으로 측정 후 환산표를 이용하여 측정한 결과, 사과박 농도 0, 5, 10% 조건에서 각각 3.0×10^{5}, 1.68×10^{6}, 1.05×10^{6} mPa · s로 나타났다.

표 15

[0071] 사과박을 첨가한 산수유 젖산발효 잼의 이화학적 특성

사과박농도	pH	산도 (%)	생균수 (CFU/mL)	당도 (° Brix)	점도 (mPa · s)
0%	4.18	2.16	0	42	3.0×10^{5}
5%	4.21	2.12	0	53	1.68×10^{6}
10%	4.21	1.98	0	50	1.05×10^{6}

[0072] GABA 생성 젖산균을 이용한 산수유 젖산발효 2일 후 사과박을 0~10% 농도로 첨가하여 펙틴 1.5%와 설탕 40%를 첨가하여 제조한 잼을 4배 희석하여 GABA 함량을 TLC를 통하여 측정하여 나타내었다(도 15). 그 결과 사과박 첨가유무에 따른 GABA 함량의 차이는 보이지 않았으며, 모든 조건에서 산수유 잼의 GABA 함량을 환산하였을 때 약 0.5% GABA 함량을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0073] 훈련된 패널 10명을 선정하여 5점법을 이용하여 사과박이 첨가된 산수유 잼의 관능평가를 실시하여 표 16에 나타내었다. 색과 단맛은 모든 조건에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 조직감은 사과박 5% 첨가된 조건에서 4.1점을 획득하여 가장 잼의 물성이 좋다고 나타났다. 그리고 전반적 기호도에서도 사과박 5% 첨가된 조건이 3.5점을 획득한 것으로 보아 젖산발효 사과박을 첨가한 산수유 젖산발효 잼 제조에는 사과박 5% 첨가한 것이 좋은 것으

로 나타났다.

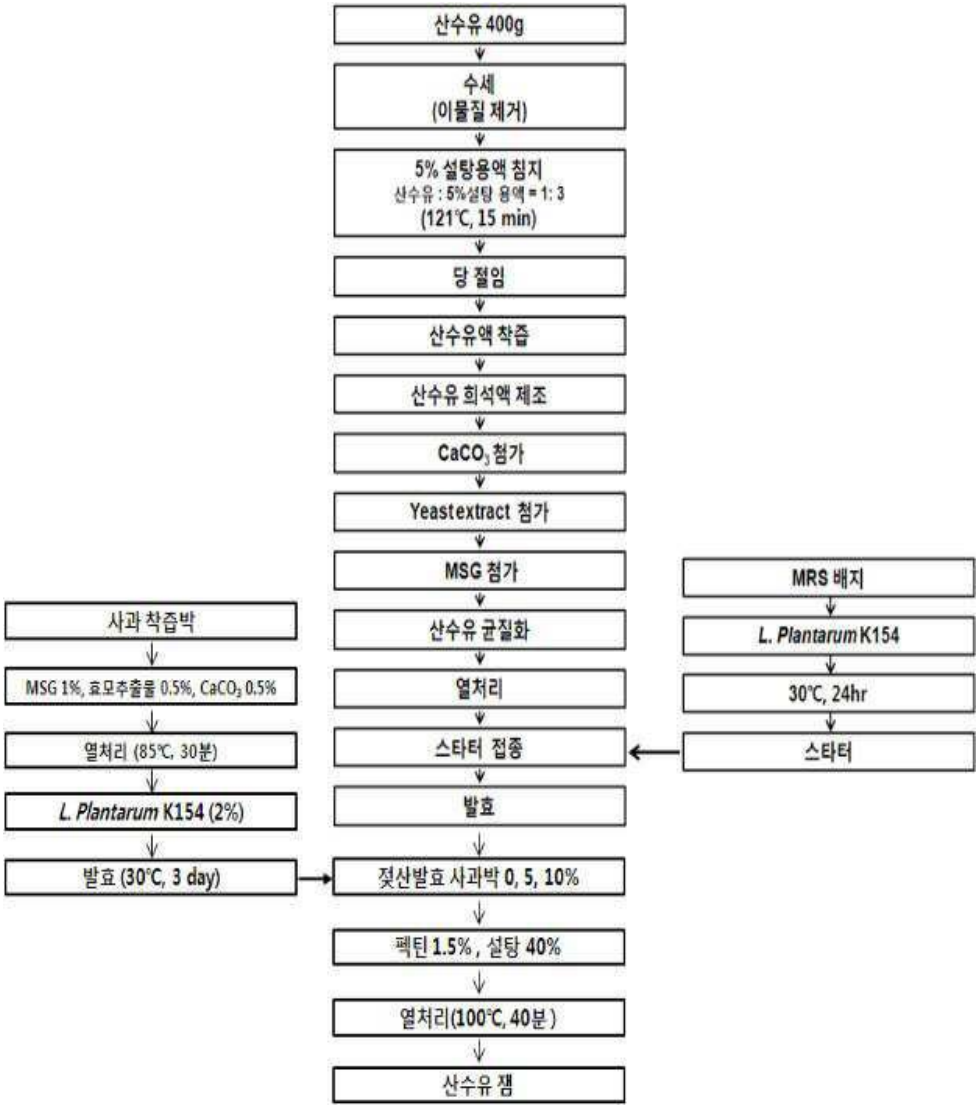
표 16

[0074] 젖산발효 사과박 첨가 산수유 젖산 발효 잼 관능평가

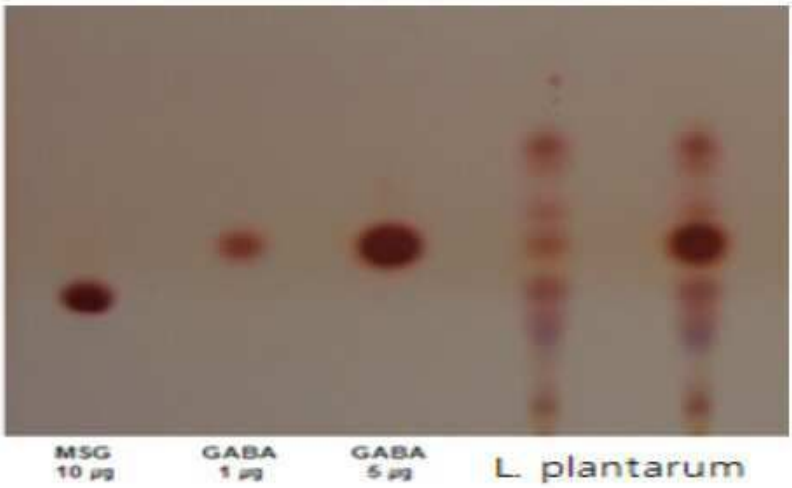
	사과박 농도		
	0%	5%	10%
색	3.4	3.2	3.3
향 미	2.7	3.3	3.4
신 맛	2.6	3.0	3.1
단 맛	3.2	2.9	2.8
조직감	2.8	4.1	3.0
전반적기호도	3.1	3.5	2.7

도면

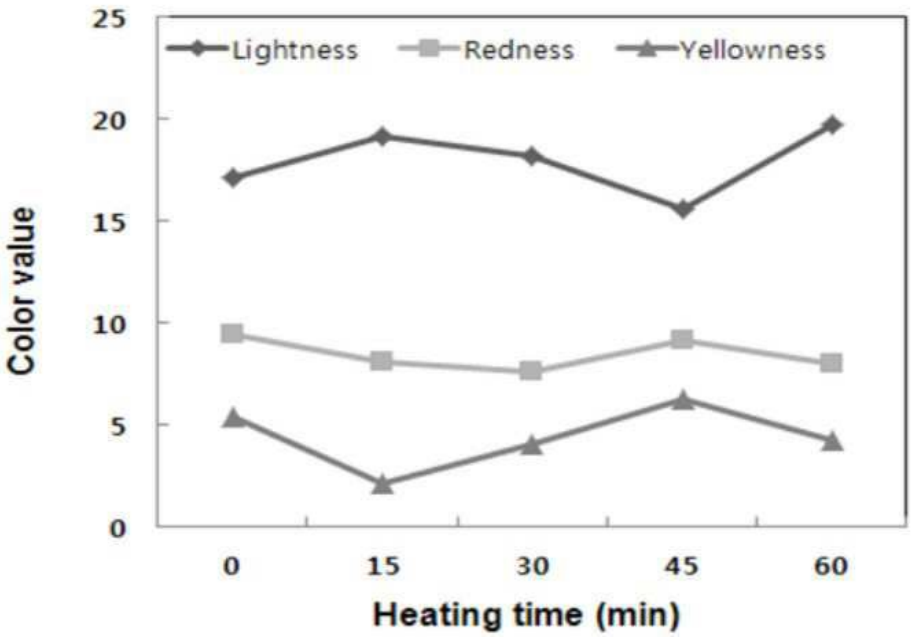
도면1



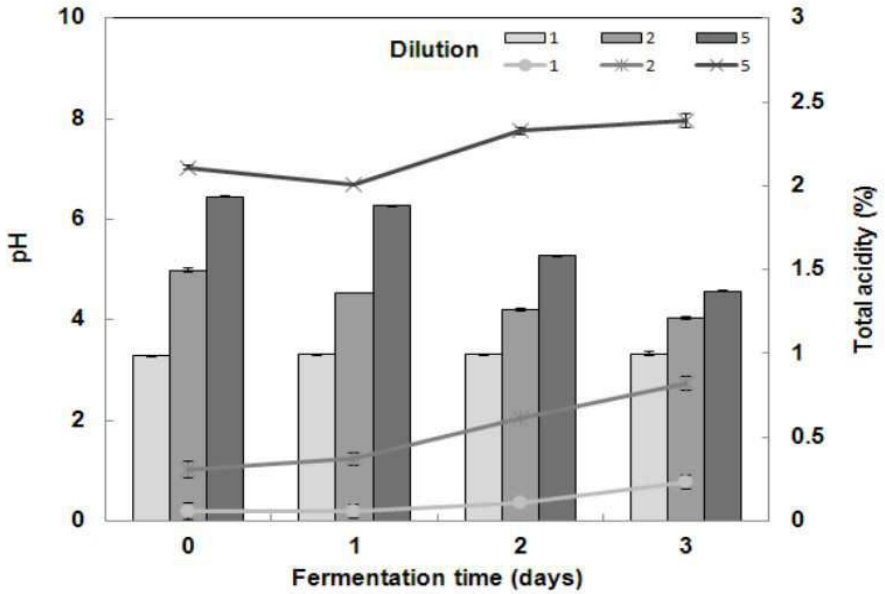
도면2


MSG
10 μg
GABA
1 μg
GABA
5 μg
L. plantarum

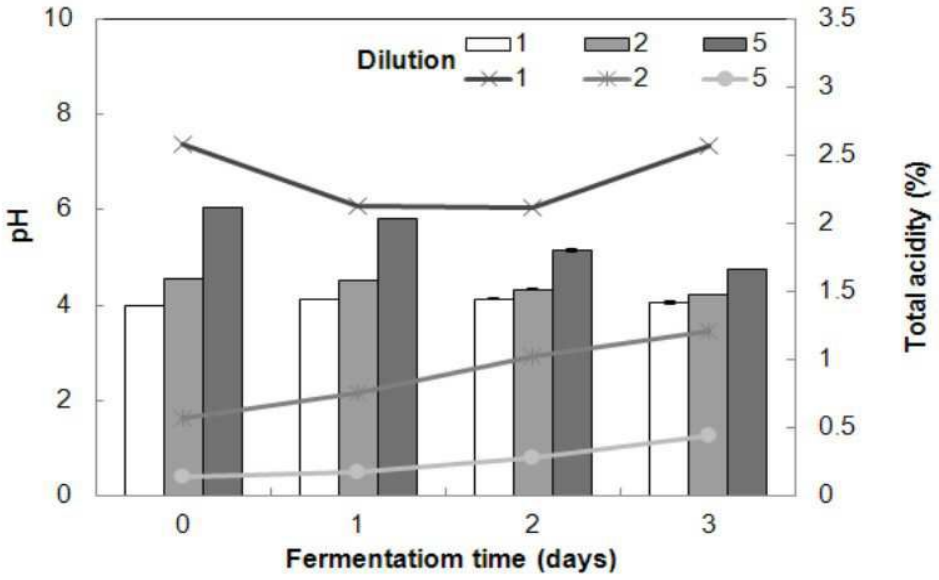
도면3


Lightness
Redness
Yellowness
Color value
25
20
15
10
5
0
0
15
30
45
60
Heating time (min)

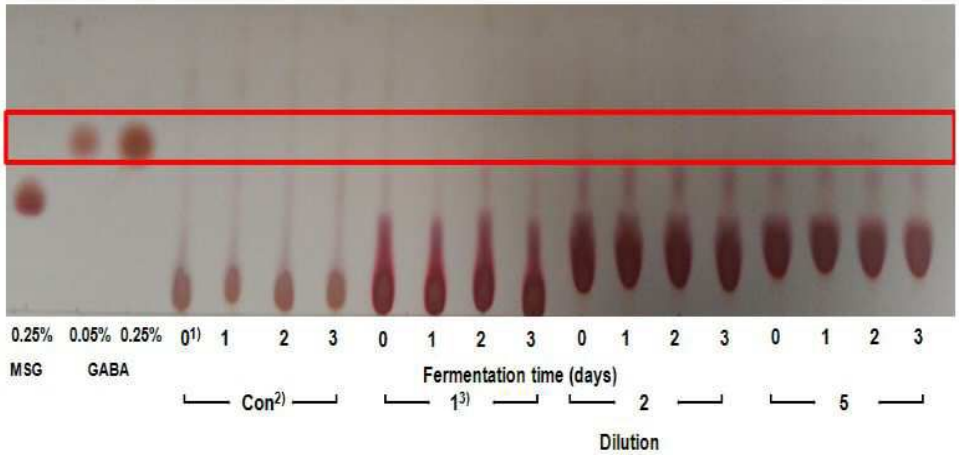
도면4


Dilution
1
2
5
1
2
5
pH
Total acidity (%)
Fermentation time (days)
0
1
2
3
0
2
4
6
8
10
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3

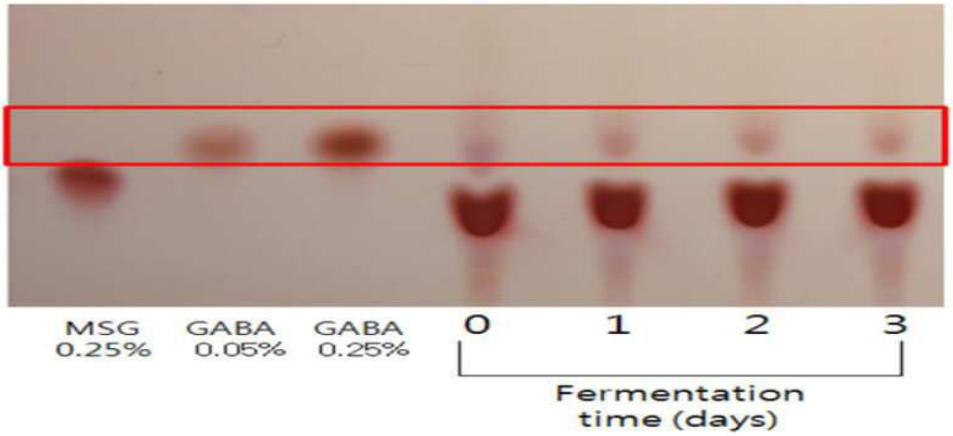
도면5


Dilution
1
2
5
1
2
5
pH
Total acidity (%)
Fermentatiom time (days)
0
1
2
3
0
2
4
6
8
10
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5

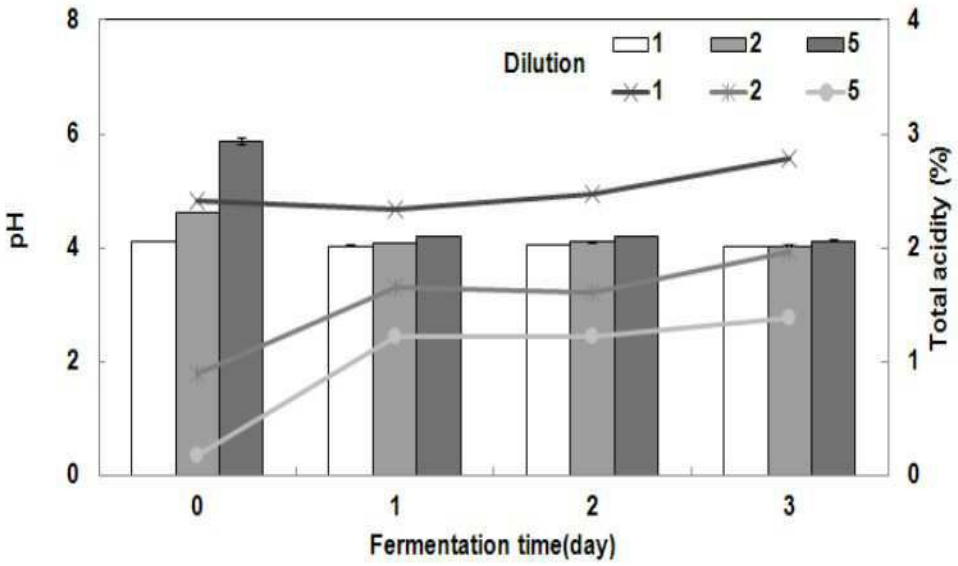
도면6


0.25% 0.05% 0.25% 0[1] 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3
MSG GABA
Fermentation time (days)
Con[2] 1[3] 2 5
Dilution

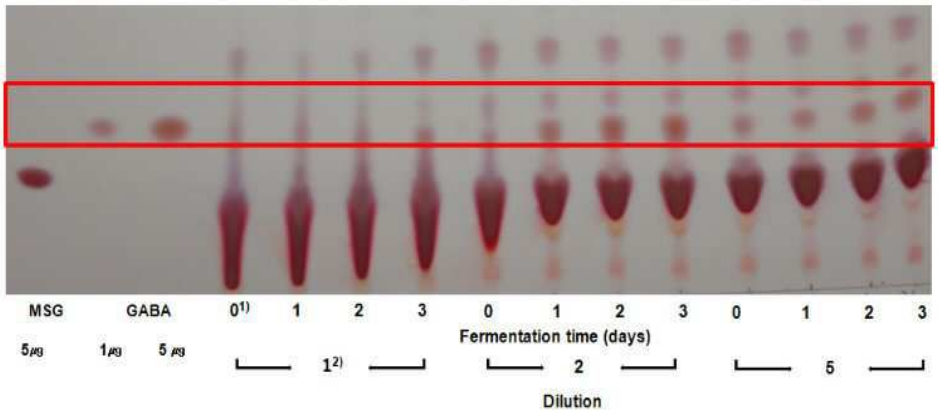
도면7


MSG 0.25%
GABA 0.05%
GABA 0.25%
0 1 2 3
Fermentation time (days)

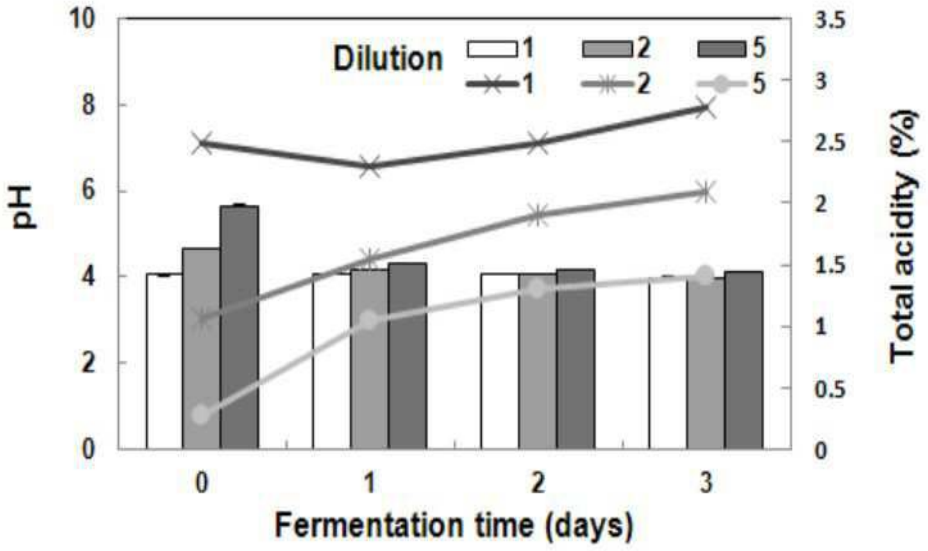
도면8


Dilution
1 2 5
1 2 5
pH
Total acidity (%)
0 2 4 6 8
0 1 2 3 4
0 1 2 3
Fermentation time(day)

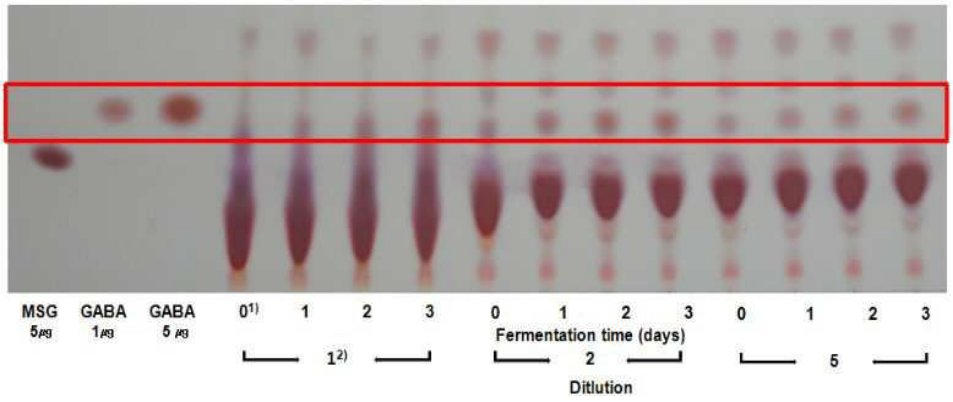
도면9



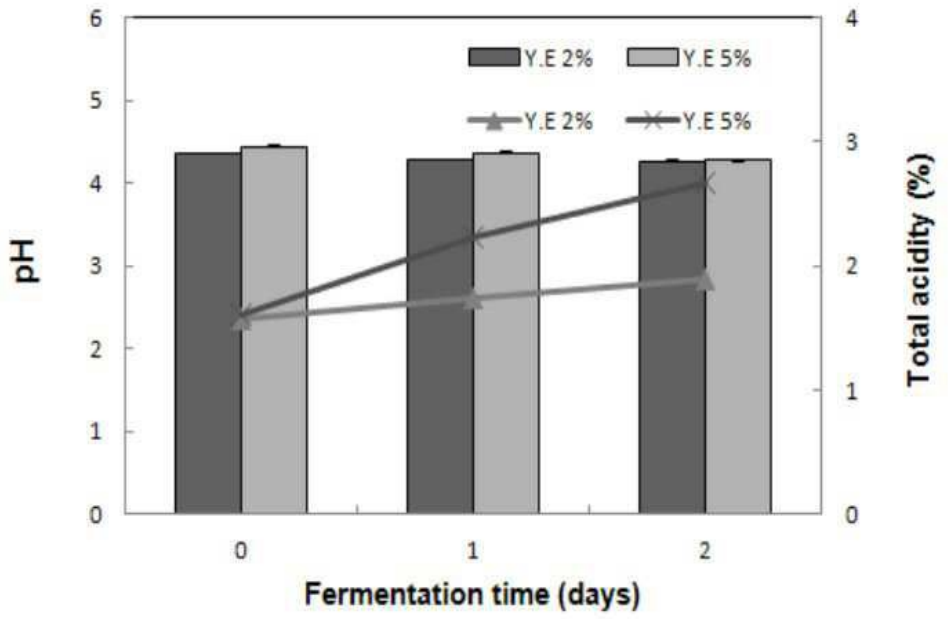
도면10



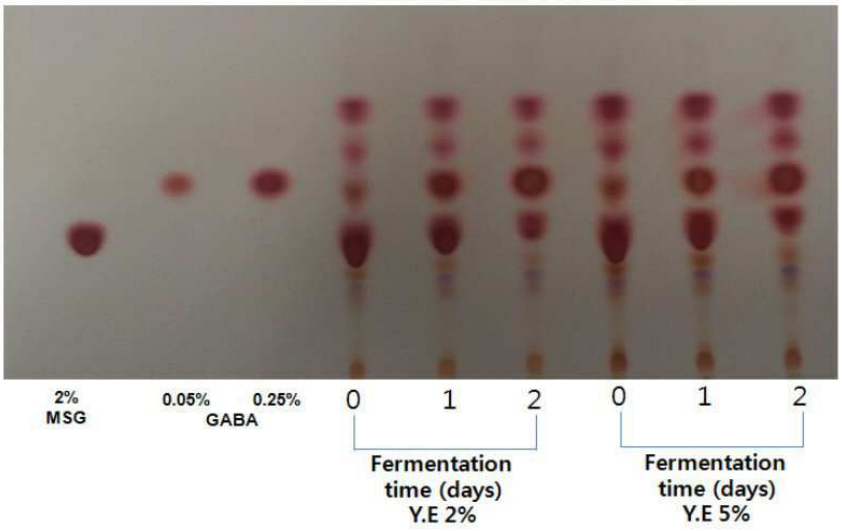
도면11



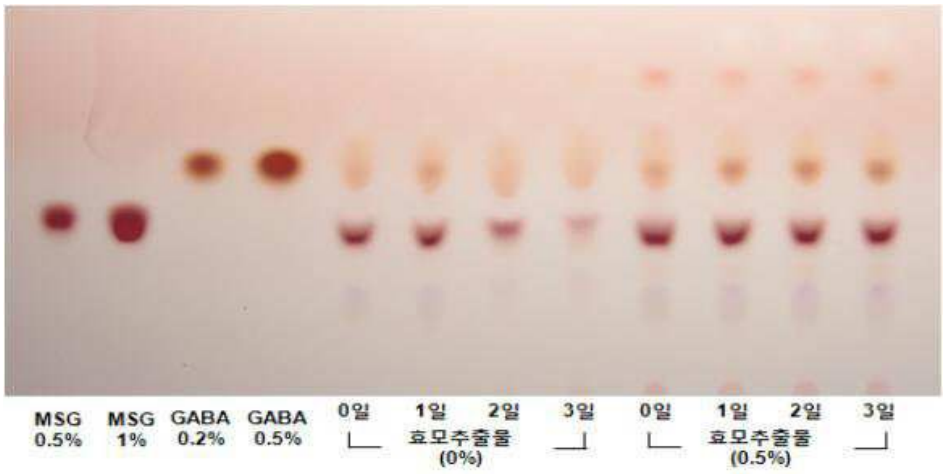
도면12


Y.E 2%
Y.E 5%
Y.E 2%
Y.E 5%
pH
Total acidity (%)
Fermentation time (days)

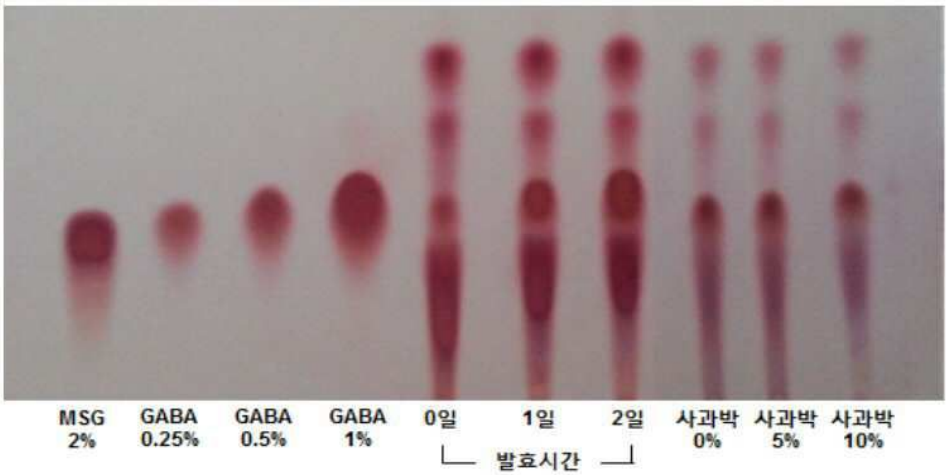
도면13


2% MSG
0.05% GABA
0.25%
0 1 2
0 1 2
Fermentation time (days) Y.E 2%
Fermentation time (days) Y.E 5%

도면14


MSG 0.5%
MSG 1%
GABA 0.2%
GABA 0.5%
0일
1일
2일
3일
효모추출물 (0%)
0일
1일
2일
3일
효모추출물 (0.5%)

도면15


MSG 2%
GABA 0.25%
GABA 0.5%
GABA 1%
0일
1일
2일
발효시간
사과박 0%
사과박 5%
사과박 10%